

Aus dem Balneologischen Forschungsinstitut Bad Krozingen

Direktor: Dr. med. habil. H. Remmlinger

GESCHLECHTSABHÄNGIGKEIT DES S^{35} -VERTEILUNGS-
MUSTERS ÜBER JEJUNALBECHERZELLEN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt

von

Klaus Dieter Remmlinger

geboren in

Freiburg i. Br.

1966



Dekan: Professor Dr. med. K. W. Kalkoff

Referent: Professor Dr. med. K. W. Kalkoff

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeines	1
1.2 Problemstellung	3
2. Material und Methodik	4
2.1 Tiermaterial	4
2.2 S^{35} -Sulfat	4
2.3 Histologischer Arbeitsgang	4
2.4 Autoradiographische Technik	5
2.5 Auswerteverfahren	6
3. Ergebnisse	7
3.1 Allgemeines zur Darstellung der Ergebnisse	7
3.2 Silberkornwerte in Jejunalbecherzellen männlicher Tiere (Gruppe 1)	8
3.3 Silberkornwerte in Jejunalbecherzellen weiblicher Tiere (Gruppe 2)	10
3.4 Statistische Auswertung für die Gruppen 1 und 2	12
3.5 Silberkornwerte in Jejunalzotten männlicher Tiere (Gruppe 3)	17
3.6 Ergebnis der statistischen Auswertung für die Gruppen G_1 , 2 und 3	20
4. Diskussion	23
5. Zusammenfassung	27

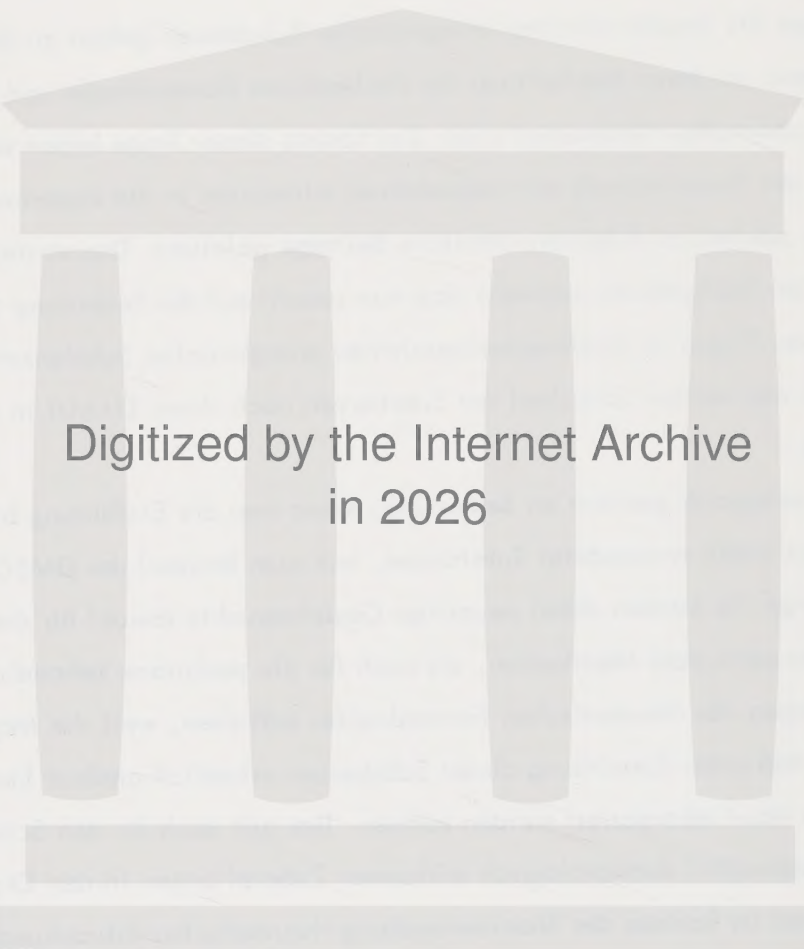
1. EINLEITUNG

1.1 ALLGEMEINES

Die Frage des Hautdurchtrittes anorganischer Substanzen gehört zu denjenigen Problemen, an deren Bearbeitung die Fachgebiete Dermatologie und Balneologie gleichermaßen interessiert sind. Zur Lösung dieser Frage haben seit Einführung der Tracertechnik mit radioaktiven Atomarten in die experimentelle Medizin zahlreiche Arbeiten nützliche Beiträge geleistet. Das weitere Interesse beider Fachgebiete erstreckt sich nun sowohl auf die Bedeutung der Haut als aktives Organ im Stoffwechselgeschehen anorganischer Substanzen, als auch auf das weitere Schicksal der Substanzen nach ihrem Eintritt in den Organismus.

Diese Problematik gewinnt an Bedeutung, wenn man die Einführung bisher therapeutisch nicht verwendeter Substanzen, wie zum Beispiel das DMSO, berücksichtigt. Es werden dabei neuartige Gesichtspunkte sowohl für die dermatologische perkutane Medikation, als auch für die perkutane Behandlung von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises auftreten, weil die Möglichkeit besteht, daß unter Einwirkung dieser Substanzen erheblich größere Stoffmengen durch die Haut inkorporiert werden können. Das gilt auch für den Schwefel, der als Bestandteil dermatologisch wirksamer Zubereitungen in den Organismus gelangt und im Rahmen der Bäderbehandlung rheumatischer Erkrankungen während des Badevorganges durch die Haut permeiert. Für die Abschätzung einer therapeutischen Wirksamkeit des Schwefels, ebenso wie für die Kalkulation eines möglichen Risikos, ist es wünschenswert, Näheres über die Rolle des Schwefels im intermediären Stoffwechsel kennenzulernen.

Von biochemischer Seite wurde die Bedeutung des Schwefels durch die Arbeiten von BERNSTEIN und Mc GILVER (1952), CANELLAKIS und TRAVER (1953),



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DZIEWIATKOWSKI (1949), DZIEWIATKOWSKI, BENESCH und BENESCH (1949), FRIDOVICH und HANDLER (1954, 1956), GRAB (1958), HILZ (1960), LAYTON (1951), LIPMANN (1958), ROBBINS und LIPMANN (1956), WILSON und BANDURSKI (1956) unterstrichen.

Für weitere Arbeiten in dieser Richtung war es wünschenswert, das intrakorporale Verteilungsmuster des Schwefels näher aufzuklären. Zu dieser Frage trugen vornehmlich Arbeiten von AMPRINO (1955), BÉLANGER (1954), BOSTRÖM (1953), BOSTRÖM, ODEBLAD und FRIBERG (1952, 1953), CAMPBELL (1951), CAMPBELL und PERSSON (1951), DAVIES und YOUNG (1954), DUTHIE und BAKER (1955), DZIEWIATKOWSKI (1951, 1952, 1953, 1954, 1956), HOLT und WARREN (1952), KNAPPEN und KRAMPITZ (1963), LEBLOND, EVERETT und SIMMONS (1957), ODEBLAD und BOSTRÖM (1952, 1963) bei.

Im Balneologischen Forschungsinstitut Bad Krozingen hat man versucht, das intrakorporale Verteilungsmuster an Hand autoradiographischer Methoden zu untersuchen und durch Anwendung moderner statistischer Untersuchungsverfahren etwa vorhandene Gesetzmäßigkeiten aus den Ergebnissen abzuleiten. Eine Arbeitsgruppe des Institutes beschäftigte sich mit dem S^{35} -Verteilungsmuster im Verdauungstrakt, weil aus Untersuchungen von BÉLANGER (1953, 1954), BOSTRÖM und ODEBLAD (1954), DAVIES und YOUNG (1954), DZIEWIATKOWSKI (1956), JENNINGS und FLOREY (1956), KENT, WHITEHOUSE, JENNINGS und FLOREY (1956) bekannt war, daß außer den bindegewebigen Anteilen der Haut und den Knorpelkomponenten des Knochens auch der Verdauungstrakt ein Haupttrefferorgan des Schwefels ist.

ASBOE-HANSEN (1959) lieferte Hinweise dafür, daß neben den seit langem bekannten geschlechtsbedingten morphologischen und funktionellen Unterschieden bei Säugetieren auch geschlechtsbedingte Unterschiede für die Stoffklasse der Mucopolysaccharide (MPS) bestehen. So soll die Mucoproteinkonzentration des Serums eine Abhängigkeit vom Oestrogen- und Progesteronspiegel zeigen. Ähnliche Abhängigkeiten sollen auch das Bindegewebe und die Schleimhäute des Genitaltraktes zeigen.

Es wäre deshalb denkbar, daß auch für MPS anderer Lokalisation, zum Beispiel im Darmschleim, geschlechtsbedingte Unterschiede bestehen. Diese Annahme soll mit der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

1.2 PROBLEMSTELLUNG

1. Läßt sich mit autoradiographischen Methoden nach intraperitonealer Applikation von $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ eine theoretisch mögliche geschlechtsbedingte Abhängigkeit im Verteilungsmuster von S^{35} über den Becherzellen des Rattendünndarms zeigen.
2. Läßt sich ein möglicher Geschlechtseffekt statistisch sichern.

2. MATERIAL und METHODIK

2.1 TIERMATERIAL

Als Versuchstiere wurden drei Gruppen mit je fünf Ratten ausgewählt.

1. Gruppe: 5 männliche Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 380 g und einem durchschnittlichen Lebensalter von 160 Tagen.
2. Gruppe: 5 weibliche Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 230 g und einem durchschnittlichen Lebensalter von 160 Tagen.
3. Gruppe: 5 männliche Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 470 g und einem durchschnittlichen Lebensalter von 370 Tagen.

Die Tiere entstammen einer Zuchteinheit (1/3) Heiligenberg-Ratten, die seit 1962 an unserem Institut weiter gezüchtet werden. Die Kontrolle des Allgemeinzustandes der Tiere erfolgte an Hand fortlaufend aufgenommener Gewichtsprotokolle.

Die Ratten erhielten eine Standarddiät (Altromin) und Leitungswasser ad libitum. Je 3 Tiere wurden in einem Makrolonkäfig (38 x 21 x 15 cm) gehalten. Die mittlere Raumtemperatur betrug $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.2 S^{35} -SULFAT

Als Tracer benutzten wir eine künstlich radioaktive Atomart des Schwefels mit dem Atomgewicht 35 (S^{35}). Die Substanz lag als $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ in wässriger Lösung vor; pH 6,8.

Die Applikation erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 0,1 mC pro 200 g Ratte.

2.3 HISTOLOGISCHER ARBEITSGANG

Die Tiere wurden 12 Stunden nach der Injektion durch Entbluten aus der

freigelegten A. abdominalis getötet und der dem Jejunalbereich entsprechende Dünndarmabschnitt 15 cm unterhalb des Pylorus entnommen. Histologisch wurde nach folgendem Plan aufgearbeitet:

10 % saures Formalin (pH 5,4) 1 bis 3 h.

Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %) je 10 min.;

Methylbenzoat I: 1 bis 4 h.

Methylbenzoat II: 12 bis 24 h.

Benzol 3 bis 8 min.; 1 mal wechseln.

Paraffin I (Schmelzpunkt 52°C): 1 bis 3 h.

Paraffin II (Schmelzpunkt 56°C ; 5 g Bienenwachs auf 100 g Paraffin):
3 bis 12 h.

Schneiden und Aufziehen (Schnittdicke $\sim 10\ \mu$).

Entparaffinieren über Xylol, absteigende Alkoholreihe je 6 min.

Nach gründlicher Wässerung staubfreie (!) Trocknung.

2.4 AUTORADIOGRAPHISCHE TECHNIK

Von den verschiedenen autoradiographischen Methoden wählten wir die sogenannte Emulsionsmethode mit der Fotoemulsion K 2 von Ilford in Gelform.

Die mittlere Korngröße der Emulsion wird vom Hersteller mit $0,20\ \mu$ angegeben.

Die Emulsion wurde mit Terminvorgabe bestellt und nach dem Eintreffen innerhalb weniger Tage aufgearbeitet. Vorversuche hatten ergeben, daß bei einem Alter der Emulsion bis zu zwei Wochen keine signifikanten Veränderungen der Empfindlichkeit auftreten.

Die Lösung der Emulsion erfolgte im Wasserbad von 50°C . Die randständig belegten Objektträger wurden in die Emulsion eingetaucht, nach Abwischen der Unterseite des Objektträgers bis zum Trocknen horizontal gelagert und anschließend bei $+5^{\circ}\text{C}$ exponiert.

Die für die Auswertung günstigste Expositionszeit wurde experimentell mit acht Tagen ermittelt.

Die Entwicklung erfolgte bei völliger Dunkelheit.

Entwickler: 7,2 g Natriumsulfit krist. p.A. ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$).

1,8 g Amidol (2,4-Diaminophenoldihydrochlorid krist.).

3,2 ml 10 % Kaliumbromid-Lösung (KBr krist.)

gelöst in 400 ml Aqua dest.

Fixierung: Gesättigte Aqua dest.-Lösung von Natriumthiosulfat p.A.

($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$).

Gebrauchslösung: Ein Teil gesättigte Lösung, zwei Teile

Aqua dest.

Ausführung: 20 min. Entwickler bei 14°C .

Kurze Zwischenwässerung.

40 min. Fixierbad.

1 h Schlußwässerung.

Nach Abschluß der staubfreien Trocknung färbten wir mit Haematoxylin-Eosin nach MAYER (Merck Med.-chem. Unters.Meth., Darmstadt, 1958) und deckten mit Eukitt ein.

2.5 AUSWERTEVERFAHREN

Zur Auswertung wurden die Silberkornzahlen über den Becherzellen des Jejunalbereiches der Ratte herangezogen. Die Becherzellen wurden gewählt, weil sie sich in diesem Bereich am eindeutigsten von den anderen morphologischen Strukturen abgrenzen lassen. Die Strecke vom Kryptengrund bis zur Zotten spitze wurde willkürlich in vier Bereiche unterteilt; in jedem Bereich wurden 40 Einzelzellen ausgezählt.

Die Situation ist in Abb. 1 veranschaulicht. Dabei handelt es sich um eine Fotomontage, mit der das gesamte Zählbereich in entsprechender Vergrößerung dargestellt wird. Jeweils eine repräsentative Becherzelle ist rechts neben dem zugehörigen Abschnitt isoliert dargestellt. Die Bezeichnungen $k_1 - 4$ kennzeichnen denjenigen Abschnitt der Gesamtstrecke Kryptengrund $\Rightarrow$ Zottenspitze, der in der Varianzanalyse als Zählstelle k_i bezeichnet wird.



Abb. 1: Übersichtsdarstellung des Bereichs Kryptengrund $\Rightarrow$ Zottenspitze mit Kennzeichnung der Zählstellen.
Obj.Vergr. der Zotte 1 : 40, Obj.Vergr. der Becherzellen 1 : 100.

3. ERGEBNISSE

3.1 ALLGEMEINES ZUR DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

Da die Versuchsergebnisse statistisch ausgewertet werden sollen, ist es nützlich, bereits bei der Darstellung der Meßwerte die später im statistischen Modell (3.4 und 3.6) benutzten Indices und sonstigen Abkürzungen zu verwenden

G Dem Versuch liegen 3 Tiergruppen ($G_1, 2, 3$) zugrunde.

Tab. I

	Geschlecht	Alter (Tage)	Gewicht (g)	n
G_1	♂	160	380	5
G_2	♀	160	230	5
G_3	♂	370	470	5

Alters- und Gewichtsangaben sind Mittelwerte aus jeweils $n = 5$ Tieren

T Die Tiere innerhalb der Gruppen werden mit T bezeichnet, der laufende Index ist $j = 1$ bis 5

Z Die Zählstelle heißt Z, der zugehörige Index ist k und zwar:

k_1 = oberes Drittel der Krypte

k_2 = basales Zottendrittel

k_3 = mittleres Zottendrittel

k_4 = oberes Zottendrittel

A Die Auszählung der Silberkörner erfolgte durch zwei voneinander unabhängige Personen (A_1 und A_2).

In den Tabellen II, III und V sind die Mittelwerte der Silberkörner pro Becherzelle (SK/BZ) für den Beobachter A_1 und A_2 angegeben.

3.2 SILBERKORNWERTE IN JEJUNALBECHERZELLEN MÄNNLICHER TIERE (GRUPPE 1)

Ein Vergleich der Werte in Tab. II deutet darauf hin, daß die SK/BZ von der Krypte zur Zottenspitze hin geringer werden. Er zeigt auch deutliche Unterschiede in den Zählergebnissen der beiden Beobachter.

Tab. II

i	k ₁		k ₂		k ₃		k ₄	
	A ₁	A ₂	A ₁	A ₂	A ₁	A ₂	A ₁	A ₂
1	23,150	28,200	22,475	22,500	15,325	13,650	11,750	11,025
2	23,675	25,650	20,650	22,800	14,550	17,175	9,475	8,825
3	22,150	26,925	17,800	20,425	10,950	14,250	9,100	8,400
4	21,125	24,675	19,000	21,300	12,000	14,000	9,075	6,600
5	15,275	22,550	16,025	14,900	9,975	10,775	7,175	6,500

Mittelwerte SK/BZ für Jejunum

A₁, A₂ = Beobachter 1 und 2

i 1 - 5 = Versuchstiere

k₁ - 4 = Zählstellen

G ₁			
♂	+	-	Tage
	160	-	
	380	+	g

3.3 SILBERKORNWERTE IN JEJUNALBECHERZELLEN WEIBLICHER TIERE (GRUPPE 2)

Ebenso wie bei den männlichen Tieren nehmen bei den weiblichen Tieren die SK/BZ von der Krypte zur Zottenspitze hin ab. Auch der Unterschied in den Zählergebnissen zwischen Beobachter 1 und 2 findet sich erwartungsgemäß wieder.

Vergleicht man die korrespondierenden Werte der männlichen und weiblichen Tiere miteinander, so bemerkt man, daß die Mittelwerte SK/BZ bei den weiblichen Tieren kleiner sind als bei den männlichen. Zur Sicherung dieser Unterschiede sind statistische Methoden geeignet.

Tab. III

i	k ₁		k ₂		k ₃		k ₄	
	A ₁	A ₂	A ₁	A ₂	A ₁	A ₂	A ₁	A ₂
1	12,725	15,100	12,475	10,200	6,500	4,925	4,275	3,150
2	12,950	16,400	14,225	13,875	8,000	8,050	4,975	5,600
3	14,875	17,400	9,925	11,800	5,875	7,875	5,275	6,000
4	21,175	22,225	13,000	18,800	10,250	12,050	7,325	7,175
5	15,650	18,500	16,350	13,900	10,325	9,575	7,200	6,975

Mittelwerte SK/BZ für Jejunum

A₁, A₂ = Beobachter 1 und 2

i₁ - 5 = Versuchstiere

k₁ - 4 = Zählstellen

G ₂			
♀	+		d
160	-		
230	+		g
	-		

3.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG FÜR DIE GRUPPEN 1 UND 3

Der einfachste Schritt zu einer statistischen Auswertung ist die Berechnung der jeweiligen Mittelwerte (m) samt zugehörigen Standardabweichungen (s).

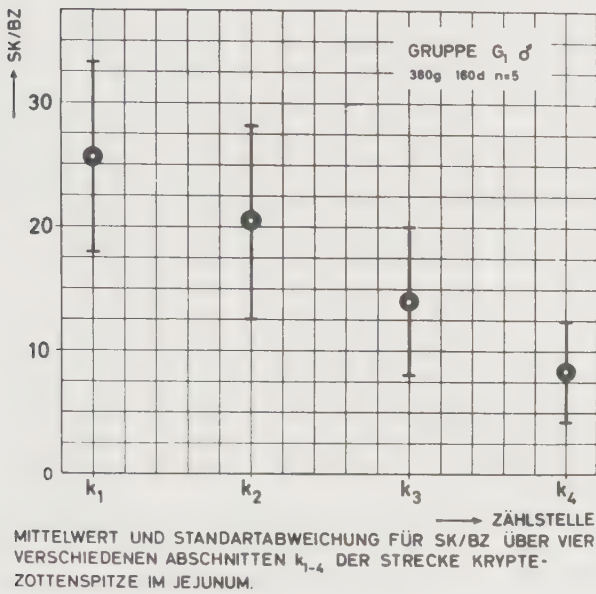


Abb. 2 a

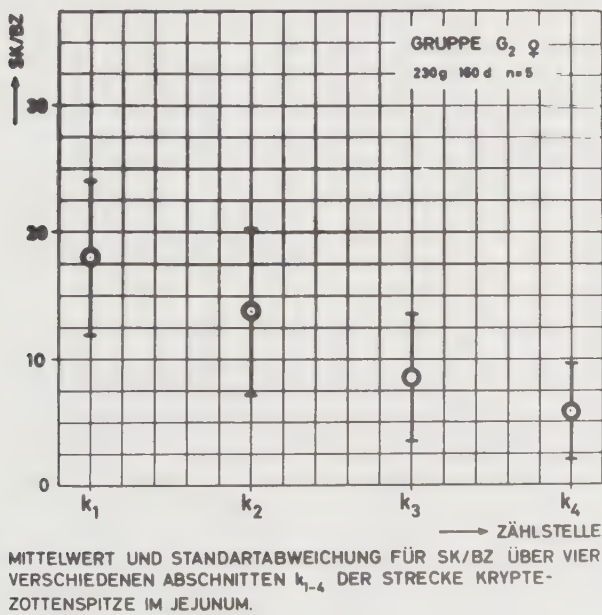


Abb. 2 b

Das wurde für die Einzelwerte der Gruppen G_1 und G_2 durchgeführt. Die erhaltenen Mittelwerte samt zugehöriger Standardabweichung sind gegen die Zählstellen aufgetragen. Der Abstand zwischen den einzelnen Zählstellen wurde willkürlich, jedoch gleich groß gewählt (Abb.2 a und 2 b).

Es wird ersichtlich, daß die Werte SK/BZ von Zählstelle K_1 zu K_4 hin sowohl bei den männlichen (G_1), als auch bei den weiblichen (G_2) Tieren kleiner werden. Alle Mittelwerte von G_1 liegen höher als diejenigen von G_2 . Bei den Gruppen G_1 und G_2 scheinen sich die Werte der Zählstellen K_1 signifikant von denen der Zählstellen K_4 zu unterscheiden. Für die Mittelwerte zweier benachbarter Gruppen ist eine derartige Aussage zunächst nicht ohne weiteres möglich.

Man könnte die in Frage stehende Signifikanz zwar an Hand des t-Testes nach STUDENT prüfen und würde so möglicherweise zu einem befriedigenden Ergebnis kommen. Damit wäre jedoch noch nichts über die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ausgesagt. Schließlich würde die Einbeziehung des Einflusses zweier verschiedener Beobachter erneute Schwierigkeiten bereiten.

Hingegen lassen sich die notwendigen Korrelationen sehr gut durch eine Varianzanalyse erreichen.

Da man die ursprünglichen Daten (Tab. II und III) als nach POISSON verteilt ansehen kann, wird zweckmäßigerweise für die varianzanalytische Auswertung eine Quadratwurzeltransformation der Daten durchgeführt. Mit den so transformierten Daten wurden die folgenden Berechnungen durchgeführt.

Wir gehen aus von dem Modell

$$x_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{ij} + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + \epsilon_{ijk}$$

wobei

x_{ijk}	= Beobachtung an der k-ten Stelle am j-ten Tier innerhalb des i-ten Geschlechts
μ	= Populationsmittel
α_i	= Effekt des i-ten Geschlechts ($i = 1, 2$)
β_{ij}	= Effekt des j-ten Tieres innerhalb des i-ten Geschlechts ($j = 1, 2, \dots, 5$)
γ_k	= Effekt der k-ten Meßstelle ($k = 1, 2, 3, 4$; 1 = Krypte, 2 = Basis, 3 = Mitte, 4 = Spitze)
$(\alpha\gamma)_{ik}$	= Wechselwirkung zwischen Geschlecht und Meßstelle
ϵ_{ijk}	= Fehler

$\mu, \alpha_i, \gamma_k, (\alpha\gamma)_{ik}$ werden als konstant angenommen, β_{ij} und ϵ_{ijk}

als zufällige Variable mit dem Mittelwert 0 und der Streuung σ_β^2 bzw. σ_{ijk}^2

Die Effekte $\gamma_k, (\alpha\gamma)_{ik}$ und der Fehler werden mit Hilfe von Orthogonalpolynomen noch in lineare, quadratische und kubische Effekte aufgeteilt, um die Beschaffenheit evtl. vorhandener Trends zu testen und näher zu beschreiben.

Unter den oben gemachten Annahmen ergibt sich dann die folgende Varianzanalyse.

Tab. IV

	Ursache	FG	SQ	MQ	F-Wert	Signifikanzgrad
1	Geschlecht	1	5,5056	5,5056	13,08	++
2	Tiere innerh. Geschlecht	8	3,3678	0,4210	15,83	+++
3	Zählstellen	3	23,5016	7,8339	294,51	+++
3 a	linear	1	23,3928	23,3928	1158,05	+++
3 b	quadr.	1	0,0476	0,0476		
3 c	kubisch	1	0,0613	0,0613		
4	Geschlecht x Meßstellen	3	0,2330	0,0777		
4 a	linear	1	0,1352	0,1352	6,69	+
4 b	quadr.	1	0,0757	0,0757		
4 c	kubisch	1	0,0220	0,0220	1,73	
5	Fehler	24	0,6377	0,0266		
5 a	linear	8	0,1612	0,0202		
5 b	quadr.	8	0,3747	0,0468		
5 c	kubisch	8	0,1017	0,0127		
6	Total	39	33,2457			

Ergebnis der Varianzanalyse mit orthogonalen Vergleichen für die Gruppen G₁ und 2. F-Werte und Signifikanzgrad sind nur dort angegeben, wo signifikante Werte auftraten.

FG = Freiheitsgrade, SQ = Summe der Abweichungsquadrate

Signifikanzgrad: +++ stark signifikante Abweichungsquadrate (P 0,1 %)

++ signifikante Abweichungsquadrate (0,1 % P 1 %)

+ schwach signifikante Abweichungsquadrate (1 % P 5 %)

Tab. IV zeigt, daß die Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren stark signifikant sind (2). Ebenso sind die Unterschiede der Zählergebnisse an den einzelnen Meßstellen stark signifikant (3), und zwar eindeutig im Sinne eines linearen Abfalles (3 a) von der Krypte bis zum oberen Zottendrittel ¹⁾).

Insgesamt gesehen ist die Wechselwirkung zwischen Geschlecht und Meßstellen (4) nicht signifikant. Die Aufteilung der zugehörigen Quadratsumme in einzelne Komponenten ergibt jedoch einen schwach signifikanten linearen Effekt (4 a). Der Vergleich der entsprechenden Mittelwerte (siehe Abb. 2 a und 2 b) in den beiden Geschlechtern zeigt einen stärkeren Abfall bei den männlichen Tieren als bei den weiblichen.

Dieser Hinweis auf einen Geschlechtseffekt scheint zunächst seine Bestätigung durch die Signifikanz (1) zu finden. Die nähere Betrachtung des Tiermaterials und der Versuchsbedingungen zeigt jedoch, daß männliche und weibliche Tiere unterschiedliches Gewicht hatten und deshalb auch für beide Geschlechter unterschiedliche Dosen S^{35} appliziert wurden.

Man bezeichnet eine derartige Verknüpfung von Effekten als "confounded". Eine Trennung ist auch mit Hilfe einer Kovarianzanalyse nicht möglich. Vielmehr ist die Einbeziehung einer weiteren männlichen oder weiblichen Versuchsgruppe in den Gesamtversuch erforderlich.

¹⁾ Zur Erleichterung der Orientierung wurden hinter der jeweiligen Aussage die laufenden Nummern aus der Tab. IV angegeben, auf die sich die Aussage bezieht.

3.5 SILBERKORNWERTE IN JEJUNALZOTTEN MÄNNLICHER TIERE (GRUPPE 3)

Als dritte Versuchsgruppe wählten wir männliche Tiere, deren mittleres Alter um den Faktor 2,31 und deren mittleres Gewicht um den Faktor 1,24 größer waren als das der Gruppe G_1 .

Die Mittelwerte SK/BZ dieser Gruppe sind in Tab. V angegeben. Wiederum finden sich deutliche Unterschiede zwischen den Beobachtern, den Zählstellen und den einzelnen Tieren der Gruppe.

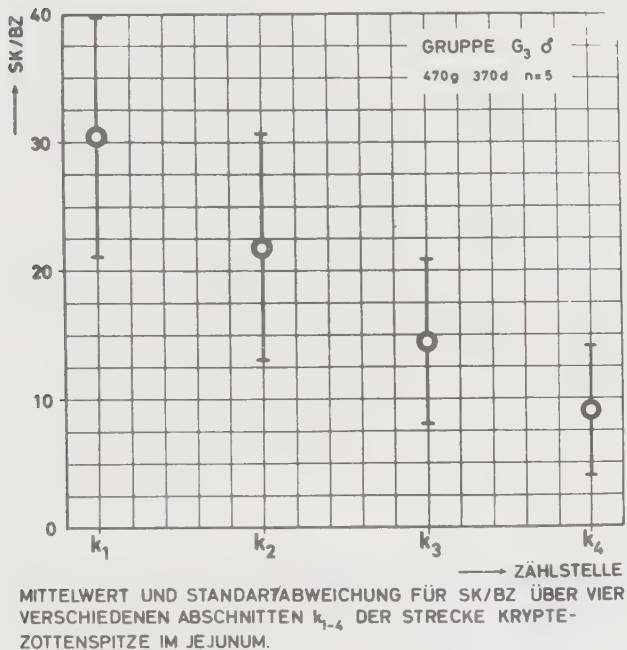


Abb. 3

Der Anschaulichkeit wegen wurden auch für diesen Versuch die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und in der vorn beschriebenen Weise grafisch dargestellt.

Schließlich erleichtert die gemeinsame Darstellung der Mittelwerte für G_1 , 2 und 3 in Abb. 4 eine vergleichende Betrachtung.

Tab.V.

i	k ₁		k ₂		k ₃		k ₄	
	A ₁	A ₂	A ₁	A ₂	A ₁	A ₂	A ₁	A ₂
1	26,425	28,400	17,675	24,250	10,025	15,450	11,350	9,450
2	19,675	30,850	23,875	20,925	12,675	12,850	9,250	6,125
3	26,000	22,700	19,025	15,450	11,200	11,520	8,700	7,020
4	31,025	34,820	26,875	25,850	16,625	16,870	12,225	12,450
5	29,125	35,000	21,100	22,300	14,300	15,100	11,500	9,780

Mittelwerte SK/BZ für Jejunum

A₁, A₂ = Beobachter 1 und 2

i₁ - 5 = Versuchstiere

k₁ - 4 = Zählstellen

G₃
♂
370 + - d
470 + - g

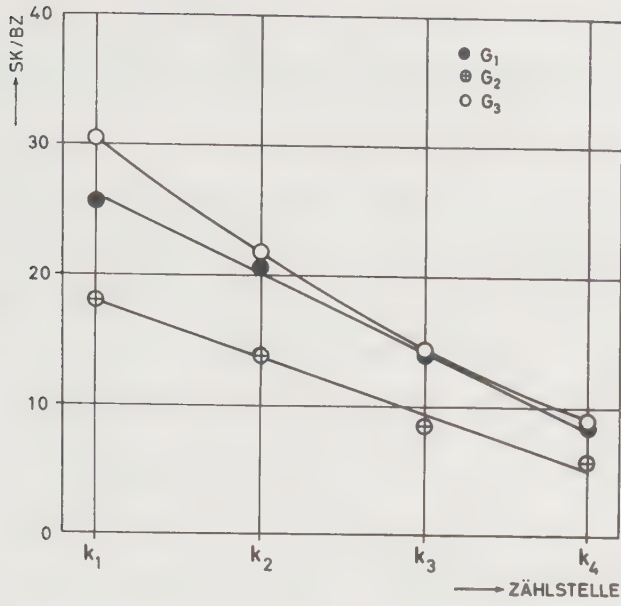


Abb. 4

Vergleichende Darstellung der Mittelwerte der Gruppen G_1 , 2 und 3 für die Zählstellen K_1 bis 4

3.6 ERGEBNIS DER STATISTISCHEN AUSWERTUNG FÜR DIE GRUPPEN $G_{1,2}$ und 3

Analog zu 3.4 wurde auch für die Werte der Gruppe G_3 eine Quadratwurzeltransformation der ursprünglichen Daten durchgeführt und dann eine Varianzanalyse mit orthogonalen Vergleichen der Effekte $\bar{Y}_k$ und $(\alpha\bar{Y})_{ik}$ vorgenommen. Das statistische Modell blieb unverändert, jedoch läuft i jetzt von 1 bis 3. Zur Erleichterung der Orientierung wurden hinter der jeweiligen Aussage die laufenden Nummern aus der Tabelle VI angegeben, auf die sich die Aussage bezieht.

Der Gruppenvergleich (1) zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den drei Tiergruppen. Zwischen den männlichen Gruppen G_1 und 3 (1 a) ist der Unterschied nicht signifikant. Hingegen besteht ein stark signifikanter Unterschied zwischen den männlichen Gruppen G_1 und 3 und der weiblichen Gruppe G_2 (1 b). Der Unterschied innerhalb der Gruppen ist ebenso wie unter 3.4 stark signifikant (2).

Der in 3.4 gefundene stark signifikante Unterschied zwischen den Zählstellen (3 in Tab. IV) ist nach Einbeziehung der zweiten männlichen Gruppe G_3 nur noch als schwach linearer Effekt nachzuweisen (3 a).

Der Einfluß der Beobachter (A) ist schwach signifikant (4).

Für die Wechselwirkung zwischen Gruppen und Zählstellen (5) zeigt die Aufteilung der Quadratsumme in einzelne Komponenten einen schwach signifikanten linearen Effekt (5 a). Das stimmt mit dem entsprechenden Ergebnis in 3.4 (4 in Tab. IV) überein.

Während die Wechselwirkung zwischen Gruppen und Beobachtern nicht signifikant ist (6), findet sich ein signifikanter Effekt bei der Wechselwirkung zwischen Zählstellen und Beobachter (7).

Diese Ergebnisse gestatten folgende Aussage:

Die mittlere Anzahl von Silberkörnern pro Becherzelle im Jejunum der Ratte

zeigt im akuten Versuch eine eindeutige Geschlechtsabhängigkeit: Männliche Tiere haben einen größeren Schwefelgehalt als weibliche. Damit findet der aus dem Ergebnis der ersten Varianzanalyse (3.4) abgeleitete Hinweis auf einen möglichen Geschlechtseffekt seine Bestätigung.

Die mittlere Anzahl der Silberkörner pro Becherzelle nimmt in der Richtung Krypte → Zottenspitze linear ab.

Das Zählergebnis wird vom jeweiligen Beobachter beeinflusst. Dieser Einfluß trägt jedoch den Charakter einer Konstanten, so daß zwei oder mehr von ein und demselben Beobachter gezählte Gruppen vergleichbar sind.

Tab. VI

	Ursache	FG	SQ	MQ	F-Wert	FG für F-Test	Signifikanz-grad
1	Gruppen (G)	2	19,3928	9,6964	13,84	(2;11)	++
1 a	Gruppe 1 gegen 3	1	1,0442	1,0442			
1 b	Gruppe 1 u. 3 gegen 2	1	18,3486	18,3486	26,19	(1;11)	+++
2	Tiere innerhalb Gruppen (T)	12	8,9366	0,7447	12,15	(12;12)	+++
3	Zählstellen (Z)	3	66,0029	22,0010			
3 a	linear	1	65,3202	65,3202	71,76	(1;1,1) ⁺	+
3 b	quadr.	1	0,0612	0,0612			
3 c	kubisch	1	0,6215	0,6215			
4	Beobachter (A)	1	0,3641	0,3614	5,94	(1;12)	+
5	Gruppen gegen Zählstellen (G x Z)	6	0,9824	0,1637			
5 a	linear	2	0,7881	0,3941	7,88	(2;6)	+
5 b	quadr.	2	0,1881	0,0941			
5 c	kubisch	2	0,0062	0,0031			
6	Gruppen gegen Beobachter (G x A)	2	0,0345	0,0173			
7	Zählstellen gegen Beobachter (Z x A)	3	1,1192	0,3731	8,54	(3;36)	++
7 a	linear	1	0,8870	0,8870			
7 b	quadr.	1	0,0004	0,0004			
7 c	kubisch	1	0,2318	0,2318			
8	Tiere gegen Zählstellen (T x Z)	36	1,2737	0,0354			
8 a	linear	12	0,2960	0,0238			
8 b	quadr.	12	0,7013	0,0584			
8 c	kubisch	12	0,2764	0,0230			
9	Tiere gegen Beobachter (T x A)	12	0,7357	0,0613			
10	G x Z x A	6	0,1500	0,0250			
10 a	linear	2	0,0625	0,0313			
10 b	quadr.	2	0,0295	0,0148			
10 c	kubisch	2	0,0580	0,0290			
11	Fehler (T x Z x A = E)	36	1,5725	0,0437			
11 a	linear	12	0,4794	0,0399			
11 b	quadr.	12	0,8947	0,0749			
11 c	kubisch	12	0,1984	0,0165			

Gesamt

119

100,5644

Ergebnis der Varianzanalyse mit orthogonalen Vergleichen für die Gruppen G_{1,2} und G₃.

F-Werte, FG für F-Test und Signifikanzgrad sind nur dort angegeben, wo signifikante Werte auftraten.

⁺) Die nicht ganzzahlige Anzahl der FG im Nenner beruht darauf, daß bei dem für 3 a, b und c approximativ durchgeführten F-Test die Anzahl der FG nach der Methode von SATTERTHWAITE (in B. OSTLE, Statistics in Research, 1960, Iowa state Univ. Press) berechnet wurde.

4. DISKUSSION

Die Becherzellen (BZ) des Magen-Darmtraktes gelten als Produktionsstätten eines sauer reagierenden Schleims (BIERRING, 1962; FLOREY, 1930, 1956, 1960, 1962; FREEMAN, 1962; JENNINGS und FLOREY, 1956; KENT, WHITEHOUSE, JENNINGS und FLOREY, 1956; MOE, 1955; SHEARMANN und MUIR, 1960; TAYLOR, 1959; WRIGHT, FLOREY und JENNINGS, 1938).

Die Zusammensetzung des Becherzellschleims ist noch nicht restlos geklärt, jedoch ist man sich heute allgemein darüber einig, daß in ihm Mucopolysaccharide (MPS) und eine Proteinkomponente enthalten sind (HOTCHKISS, 1948; KOMAROV, 1953). Die Zuckerkomponente enthält Hexosamin entweder frei oder mit Schwefelsäure verestert (MEYER, 1936). Die sauren MPS enthalten noch Glukuronsäure. Der Grund für die noch geringen Kenntnisse der Chemie der Schleimsubstanzen liegt in der Schwierigkeit der Isolierung und der Leichtigkeit begründet, mit der diese Stoffe sich bei den Darstellungsmethoden verändern (FLOREY, 1955).

Da bis heute noch keine spezifische Schleimfärbung bekannt ist, lassen sich jeweils nur einzelne Schleimkomponenten färberisch nachweisen. Zu den am häufigsten benutzten Nachweisreaktionen gehört die Bauer'sche Polysaccharidreaktion, die Perjodatreaktivität und die Metachromatropie. Verfolgt man den Ausfall dieser Methoden über die verschiedenen Darmabschnitte, so gelangt man zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Die Bauer'sche Polysaccharidreaktion nimmt vom Duodenum in Richtung Rektum an Intensität ab, ebenso die Perjodatreaktivität, während umgekehrt die Metachromatropie in gleicher Richtung zunimmt.

Die PAS-Reaktion (Periodic Acid-Schiff) beruht auf der Anwesenheit von Glykolen, die von der Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxydiert werden, welche sich mit Leukofuchsin (Schiff'sches Reagenz) rot färben.

Die Erscheinung der Metachromatopie wird dem Vorhandensein von sulfatierten MPS zugeschrieben (CURRAN und KENNEDY, 1955; ODEBLAD und BOSTRÖM, 1952), ohne jedoch für diese spezifisch zu sein. Dem Bereich mit starker Metachromatopie entspricht nach autoradiographischen Untersuchungen von JENNINGS und FLOREY (1956) die stärkste S^{35} -Aktivität.

Für die Identifizierung und Lokalisation von sulfathaltigen Schleimen kommt die autoradiographische Methode mit Anwendung von S^{35} in anorganischer Form in Betracht (JENNINGS und FLOREY, 1956). S^{35} wird in der Schleimhaut des Intestinaltraktes angereichert. (ODEBLAD und BOSTRÖM, 1952; BOSTRÖM und ODEBLAD, 1953). Die Hauptaktivität konnte im Schleim selbst lokalisiert werden (BOSTRÖM, 1953). Hiernach sind die Becherzellschleime größtenteils sulfathaltig, enthalten also Sulfomucopolysaccharide (SMPS). Die Frage, in welchen chemischen Verbindungen der radioaktive Schwefel vorliegt, ist mit den Ergebnissen der beschriebenen Versuche allerdings nicht zu beantworten. Es läßt sich auch mit den oben zitierten Autoren und ihren biochemischen und histochemischen Untersuchungsergebnissen kaum ein Ausgangspunkt für Überlegungen bezüglich der möglichen Bindungsart des S^{35} finden. Ob also S^{35} über die Stufe des aktivierten Sulfates (LIPMANN, 1958; ROBBINS und LIPMANN, 1956) in die SMPS eingebaut worden ist oder nur als $S^{35}O_4^{--}$ -Ion in der Zelle gespeichert vorliegt (JENNINGS und FLOREY, 1956), ist nicht zu sagen. Für die verwandte Stoffart Histamin wird eine sulfonamidartige Bindung der Schwefelsäurereste an die Aminogruppe des Glukosamins angenommen (LEUTHARD, 1961).

Da das S^{35} -Verteilungsmuster und somit also auch die S^{35} -Aufnahme mit einigen dieser oben genannten Nachweisreaktionen, die sich auf Stoffwechselprodukte der BZ beziehen, gleichlaufen oder entgegenlaufen, kann man wohl annehmen, daß die für einen Effekt verantwortliche Aktivität auf den in die SMPS eingebauten Schwefel zurückzuführen ist.

Da der vorliegenden Arbeit ein akuter Versuch zugrunde liegt, kann man nur über den augenblicklichen Zustand der S^{35} -Verteilung über den Jejunalbecherzellen der Ratte 12 Stunden nach der $Na_2S^{35}O_4$ -Applikation etwas aussagen und schwerlich auf die Verhältnisse vor oder nach diesem Zeitpunkt schließen. Die Ergebnisse sind eine Momentaufnahme eines zeitabhängigen Ablaufes.

Die Resultate des beschriebenen Versuches zeigen ein geschlechtsabhängiges Ergebnis. Wenn man nun annimmt, daß intraperitoneal appliziertes $Na_2S^{35}O_4$ in den Stoffwechsel der BZ einbezogen wird, so muß man sich überlegen, inwieweit das Stoffwechselgeschehen einzelner Körperzellen, in diesem Fall der Jejunalbecherzellen, vom Geschlecht des untersuchten Tieres abhängig sein könnte. Für die Zellen des Genitaltraktes ist eine geschlechtsabhängige Stoffwechsellage bekannt, für die Jejunalbecherzelle ist in der Literatur jedoch kein Anhaltspunkt für eine solche zu finden. Nach den Ergebnissen müßte aber eine solche Abhängigkeit vorhanden sein.

HOUSSAY und BLUMENKRANTZ (1962) weisen auf eine Schwankung im Mucoproteinspiegel des Serums und der Lymphe entsprechend den Oestrogenspiegelschwankungen bei der weiblichen Ratte hin. ASBOE-HANSEN (1959) untersuchte den SMPS-Gehalt von Mastzellen des Bindegewebes und zeigte, daß Hormone auf die Enzymsysteme der Zellen einwirken können. Ferner schreibt ASBOE-HANSEN (1959) den Oestrogenen eine verstärkende und dem Progesteron eine abschwächende Wirkung auf den Einbau von S^{35} in die SMPS der Mastzellen zu.

Danach kann man also sagen, daß das Hormonmuster sowohl des weiblichen als auch des männlichen Organismus Wirkungen auf das Stoffwechselgeschehen in den einzelnen Körperzellen ausüben kann, ohne daß man den Mechanismus und die Art dieser Wirkung näher erklärt.

Wollte man nun die oben genannten Verhältnisse auf den speziellen Fall der Jejunalbecherzelle übertragen, so wären solche Überlegungen rein spekulativ.

tiver Natur, da mit der hier verwendeten Versuchsanordnung die Ursachen des vorhandenen Geschlechtsunterschiedes nicht zufriedenstellend erklärt werden könnten.

Betrachtet man die Werte der Tabellen II, III und IV, so fällt noch auf, daß von Zählstelle k_1 bis Zählstelle k_4 ein Aktivitätsabfall zu beobachten ist. Das heißt, daß die S^{35} -Aktivität von der Krypte zur Zottenspitze hin abnimmt. Dieser Abfall muß wohl im Sekretionsmechanismus der BZ begründet liegen. Aus Arbeiten von CLARA (1926), FLOREY (1932), LIPKIN, BELL und SHERLOK (1963), NASSONOV (1923) und SCHUMANN (1936) geht hervor, daß in den kryptenständigen BZ die Biosynthese des Schleims am stärksten ist und zur Zottenspitze hin immer schwächer wird, während die Schleimsekretion von der Krypte zur Zottenspitze hin immer stärker wird. Dieser Sekretionsmechanismus wäre in der Lage, die Erscheinung dieses Aktivitätsabfalles zu erklären, wenn man annimmt, daß die Silberkorndichte über der BZ der Ausdruck eines momentanen Funktionszustandes der betreffenden BZ ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der Literatur finden sich Anhaltspunkte dafür, daß neben den bekannten geschlechtsbedingten morphologischen und funktionellen Unterschieden bei Säugetieren auch geschlechtsbedingte Unterschiede für gewisse Stoffklassen wie zum Beispiel die Mucopolysaccharide bestehen.

Im Rahmen eines am Balneologischen Forschungsinstitut Bad Krozingen durchgeführten Forschungsvorhabens über das Schwefelverteilungsmuster im Verdauungstrakt der Ratte sollte geprüft werden, ob sich derartige Unterschiede auch an den sulfomucopolysaccharidhaltigen Becherzellen im Jejunum der Ratte nachweisen lassen. Zu diesem Zweck wurden autoradiographische Untersuchungen nach vorheriger intraperitonealer Gabe von 0,1 mC S-35-Natriumsulfat/200 g Ratte an zwei männlichen und einer weiblichen Tiergruppe durchgeführt. Die durch Auszählung der Silberkörner pro Becherzelle erhaltenen Meßwerte wurden varianzanalytisch untersucht. Es ergab sich ein Geschlechtseffekt in dem Sinne, daß der Gehalt an radioaktivem Schwefel bei den männlichen Tieren stark signifikant ($P < 0,1 \%$) größer war als bei den weiblichen. Weiter fand sich, daß der Schwefelgehalt pro Becherzelle bei beiden Geschlechtern in der Richtung Kryptengrund → Zottenspitze linear abnimmt. Dieser Befund läßt sich am ehesten mit einer in gleicher Richtung zunehmenden Sekretionsleistung der Becherzellen erklären.

LITERATURVERZEICHNIS

- AMPRINO, R.
Experientia 11 (1955) 19
Experientia 11 (1955) 65
Acta Anat. 24 (1955) 121
- ASBOE-HANSEN, G.
Amer. J. Med. 26 (1959) 470
- BÉLANGER, L.F.
Nature 172 (1953) 1150
Canad. J. Biochem. and Physiol. 32 (1954) 161
- BERNSTEIN, S. und
R.W. Mc GILVER
J. Biol. Chem. 198 (1952) 195
J. Biol. Chem. 199 (1952) 745
- BIERRING, F.
Acta Path. Microbiol.Scand. 54 (1962) 241
- BOSTRÖM, H.
Arkiv för Kemi 6 (1953) 43
- BOSTRÖM, H. und
E. ODEBLAD
Anat. Rec. 115 (1953) 505
Acta Psychiatr. et Neurol.Scand.
28 (1953) 1
Acta Physiol. Scand. 32 (1954) 124
- BOSTRÖM, H., E. ODEBLAD
und U. FRIBERG
Arch. Biochem. and Biophys. 38 (1952) 283
Acta Path. et Microbiol. Scand.
32 (1953) 516
- CAMPBELL, D.
Nature 167 (1951) 274
- CAMPBELL, D.
und B.H. PERSSON
Experientia 7 (1951) 304
- CANELLAKIS, E.S. und
H. TARVER
Arch. Biochem. Biphys. 42 (1953) 387
- CLARA, M.
Z. mikrosk.anat.Forsch. 6 (1926) 256
- CURRAN, R.C. und
J.S. KENNEDY
J. Path.Bact. 70 (1955) 449
- DAVIES, D.V. und
L. YOUNG
Nature 173 (1954) 448
J. Anat. 88 (1954) 175

- DUTHIE, R.B. und
A.N. BARKER J. Bone Joint Surg. 37-B (1955) 304
- DZIEWIATKOWSKI, D.D. J. Biol. Chem. 178 (1949) 389
Fed. Proc. 10 (1951) 178
J. Exper. Med. 93 (1951) 451
Transactions of the 4. Conf. on Metabolic
Interrelation (1952) 74
Fed. Proc. 12 (1953) 199
J. Exper. Med. 99 (1954) 283
J. Biophys. and Biochem. Cytol. 2 (1956) 29
- DZIEWIATKOWSKI, D.D.,
R.E. BENESCH und R. BENESCH J. Biol. Chem. 178 (1949) 931
- FLOREY, H.W. Brit. J. Exp. Path. 11 (1930) 348
Brit. J. Exp. Path. 13 (1932) 349
Proc. Roy. Soc. B. 143 (1955) 147
Gastroenterologia 85 (1956) 140
Quart. J. Exp. Physiol. 45 (1960) 329
Gastroenterology 43 (1962) 326
- FREEMAN, J.A. Anat. Rec. 144 (1962) 341
- FRIDOVICH, H. und
P. HANDLER Fed. Proc. 13 (1954) 212
- GRAB, W. Zschr. angew. Bäder-Klimahk. 5 (1958) 3
- HILZ, H. Habilitationsschrift, Hamburg (1960)
- HOLT, M.W. und
S. WARREN Amer. J. Path. 28 (1952) 556
- HOTCHKISS, R.D. Arch. Biochem. 16 (1948) 131
- HOUSSAY, A.B. und
N. BLUMENKRANTZ Nature 194 (1962) 482
- JENNINGS, M.A. und
H.W. FLOREY Quart. J. Exper. Physiol. 41 (1956) 131

KNAPPEN, F. und G. KRAMPITZ	Nature <u>197</u> (1963)
KOMAROV, S.A.	J.Nat.Cancer Inst. <u>13</u> (1953) 1007
LAYTON, L.L.	Cancer <u>4</u> (1951) 198
LEBLOND, C.B., N.B. EVERETT und B.SIMMONS	Amer.J. of Anat. <u>101</u> (1957) 225
LEUTHARDT, F.	Lehrb. der Physiologischen Chemie (1961) 38
LIPKIN, M., B. BELL und P. SHERLOCK	J. of Clin. Invest. <u>42</u> (1963) 767
LIPMANN, F.	Science <u>128</u> (1958) 575
MEYER, K.	Cold.Spring Harb.Symp.quant. Biol. <u>6</u> (1938) 91
MOE, H.	Internat.Rev. of Cytol. <u>4</u> (1955) 299
NASSONOV, D.N.	Arch.microskop.Anat. u. Entwicklungsmech. <u>97</u> (1923) 136
ODEBLAD, E. und H. BOSTRÖM	Acta Path. et Microbiol.Scand. <u>31</u> (1952) 339 Nord.Med. <u>48</u> (1952) 962 Acta Chem.Scand. <u>7</u> (1953) 233
ROBBINS, P.W. und F. LIPMANN	J. Amer.Chem.Soc. <u>78</u> (1956) 2652
SCHUMANN, G.	Z.Zellforsch.u.microsk.Anat. <u>24</u> (1936) 540
SHEARMANN, D. und A. MUIR	Quart.J.Exper.Physiol. <u>45</u> (1960) 337
TAYLOR, J.H.	Anat.Rec. <u>133</u> (1959) 434 abstract
WILSON, L.G. und R.S. BANDURSKI	Arch.Biochem.Biophys. <u>62</u> (1956) 503
WRIGHT, R.D., H.W.FLOREY und M.A. JENNINGS	Quart.J.Exper.Physiol. <u>28</u> (1938) 207

Herrn Professor KALKOFF, Freiburg i.Br., danke ich für die Überlassung des Themas und wertvolle Anregungen zur Gestaltung der Gesamtarbeit.

Herrn Professor WALTER, Freiburg i.Br., habe ich für die Einführung in die Methodik der Varianzanalyse zu danken.

Dem Bundesministerium für Gesundheitswesen sowie dem Deutschen Bäderverband e.V. Bonn bin ich für die finanzielle Unterstützung für das Zustandekommen der Arbeit zu Dank verpflichtet.

Der Balneologischen Forschungsgesellschaft e.V. Bad Krozingen danke ich für die Einrichtung eines speziellen Arbeitsplatzes sowie für die Unterstützung bei der technischen Durchführung der Untersuchungen.

Lebenslauf

Am 28.2.1938 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. med. Heinz Remmlinger und seiner Ehefrau Irmentraut, geb. Berkofsky, in Freiburg i.Br. geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Bad Krozingen von 1945 bis 1949 habe ich die Höhere Schule besucht und im März 1960 am Naturwissenschaftlichen Gymnasium in Neustadt/Schwarzwald das Abitur abgelegt.

Von Mai 1960 bis März 1962 habe ich an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br. Medizin studiert und am 31.10.1961 die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestanden.

Im Mai 1962 setzte ich mein Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg fort, wo ich am 29.10.1963 die ärztliche Vorprüfung bestanden habe.

Am 25.4.1964 habe ich mich mit Fräulein Gisela Klein verheiratet.

Im Herbst 1964 habe ich am Balneologischen Forschungsinstitut Bad Krozingen mit den Vorversuchen für meine Promotionsarbeit begonnen, deren Ergebnisse ich im Frühjahr 1966 vorlegen konnte.

Das medizinische Staatsexamen beabsichtige ich im Herbst 1966 an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg abzulegen.

